

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KIM, Seog-Hyun
9th Floor, Daekyung Bldg. 120, 2-ka
Taepyung-ro, Chung-ku
Seoul 100-724
Republic of Korea

Date of mailing (day/month/year) 13 August 2003 (13.08.03)	
Applicant's or agent's file reference OP03-1029	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/KR03/01301	International filing date (day/month/year) 02 July 2003 (02.07.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 02 July 2002 (02.07.02)
Applicant GENOMINE INC. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
02 July 2002 (02.07.02)	10-2002-0038011	KR	21 July 2003 (21.07.03)

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 338-70-90</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold;">Dominique DELMAS</p> <p>Telephone No. (41-22) 338 9543</p>
---	--

REC'D 21 JUL 2003	
WIPO	PCT

PCT/KR 03/01301

RO/KR 02.07.2003

7/2

10/519476

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

출원번호 : 10-2002-0038011
Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 02일
Date of Application JUL 02, 2002

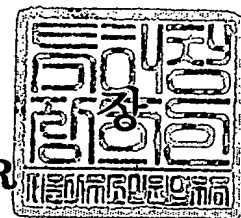
출원인 : 제노마인(주) 외 1명
Applicant(s) GENOMINE INC., et al.



2003 년 07 월 02 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.08.09
【제출인】	
【명칭】	(주)제노마인
【출원인코드】	1-1999-062412-6
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	한국화학연구원
【출원인코드】	3-1998-007765-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	1999-069596-3
【포괄위임등록번호】	2002-049252-6
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0038011
【출원일자】	2002.07.02
【심사청구일자】	2002.07.02
【발명의 명칭】	KAPA 신타제 효소 기능을 갖는 식물의 신규 폴리펩티드 및 상 기 폴리펩티드의 발현을 저해하여 식물 생장 억제 및 치사를 유발하는 방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-02-0211254-34
【접수일자】	2002.07.02
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정
에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
김석현 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【첨부서류】 1. 보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정대상항목】 식별번호 69

【보정방법】 정정

【보정내용】

서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되고, *Bgl*II 부위가 포함된 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *AtKAPAS* DNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bgl*II로 절단하고, 발아시기에 식물체의 치사를 피하기 위하여 pCAMBIA-3301 벡터(포항 공대 생명과 실험실로부터 제공받아 사용함)의 CaMV 35S 프로모터 대신에 *sen1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 안티센스 방향으로 클로닝하여 *AtKAPAS* 유전자에 대한 안티센스 구성체인 pSEN-K 재조합 벡터를 제작하였다(도 5 참조). 상기에서 *sen1* 프로모터는 식물의 생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.07.02
【발명의 명칭】	K A P A 신타제 효소 기능을 갖는 식물의 신규 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드의 발현을 저해하여 식물 생장 억제 및 치사를 유발하는 방법
【발명의 영문명칭】	Novel polypeptide having function of 7 -keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide
【출원인】	
【명칭】	(주)제노마인
【출원인코드】	1-1999-062412-6
【출원인】	
【명칭】	한국화학연구원
【출원인코드】	3-1998-007765-1
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	1999-069596-3
【포괄위임등록번호】	2002-049252-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이동희
【성명의 영문표기】	LEE, Dong Hee
【주민등록번호】	650404-1101511
【우편번호】	614-070
【주소】	부산광역시 부산진구 연지동 175-20
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고재흥
【성명의 영문표기】	KO, Jae Heung
【주민등록번호】	670215-1069519

【우편번호】	121-050
【주소】	서울특별시 마포구 마포동 214번지 광성빌라 401호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김태훈
【성명의 영문표기】	KIM,Tae Hoon
【주민등록번호】	730716-1122320
【우편번호】	609-320
【주소】	부산광역시 금정구 부곡동 264-8
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박유신
【성명의 영문표기】	PARK,Yu Shin
【주민등록번호】	591012-1466718
【우편번호】	790-330
【주소】	경상북도 포항시 남구 효자동 253-6 승리아파트 2동 403호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조광연
【성명의 영문표기】	CHO,Kwang Yun
【주민등록번호】	460326-1046511
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 383-21
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황인택
【성명의 영문표기】	HWANG,In Taek
【주민등록번호】	571225-1495611
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 115-303
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	최정섭
【성명의 영문표기】	CHOI, Jung Sup
【주민등록번호】	640210-1474518
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 102-1106
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	민용기
【성명의 영문표기】	MIN, Yong Ki
【주민등록번호】	600722-1402821
【우편번호】	302-280
【주소】	대전광역시 서구 월평동 황실아파트 117-106
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	김태준
【성명의 영문표기】	KIM, Tae-Joon
【주민등록번호】	610503-1029517
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 305-302
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	이선우
【성명의 영문표기】	LEE, Seon-Woo
【주민등록번호】	670228-1268420
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 103-805
【국적】	KR

【심사청구】

청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행(KCTC)
【수탁번호】	KCTC 10210BP
【수탁일자】	2002.03.26

【미생물기탁】

【기탁기관명】 한국생명공학연구소 유전자은행(KCTC)

【수탁번호】 KCTC 10211BP

【수탁일자】 2002.03.26

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 6

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
김석현 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 17 면 17,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 18 항 685,000 원

【합계】 731,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 365,500 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_2통 3. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물의 바이오틴 생합성 과정에 관여하는 신규 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 그리고 상기 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하여 바이오틴 생합성을 저해함으로써 식물의 생장 억제를 유발하는 방법에 관한 것이다. 바이오틴 생합성 과정은 식물의 생장에는 필수적이거나, 동물 및 인간에게는 존재하지 않는다. 따라서, 식물의 바이오틴 생합성 과정에 관여하는 본 발명의 신규 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하는 물질은 동물 및 인간에게는 무해한 새로운 제초제로 이용될 수 있다.

【대표도】

도 6a

【색인어】

바이오틴 생합성, K A P A 신타제, 제초제

【명세서】

【발명의 명칭】

K A P A 신타제 효소 기능을 갖는 식물의 신규 폴리펩티드 및 상기 폴리펩티드의 발현을 저해하여 식물 생장 억제 및 치사를 유발하는 방법{Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminopelargonic acid synthase of plant and method for inducing growth inhibition and lethality by suppressing expression of the polypeptide}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 애기장대 *AtKAPAS* 유전자의 염기서열로부터 추정되는 아미노산 서열을 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 스파에리쿠스(*Bacillus sphaericus*)의 KAPA 신타제(synthase) 아미노산 서열과 비교하여 나타낸 것이다. 아미노산 서열이 유사한 부분은 검은색 블록으로 표시하였다.

도 2는 *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 및 벡터만으로 형질전환된 대조균 대장균으로부터 분리한 조추출액을 칼모둘린 어피니티 크로마토그래피(calmodulin affinity chromatography)를 통하여 2mM EDTA로 분리한 후, 분리된 각 분액(fraction)에서 단백질 양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

●: *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균

○: 벡터만으로 형질전환된 대조균 대장균

도 3은 *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 및 대조균 대장균 용출액의 각 크로마토그래피 분액 중 12번에서 14번까지의 분액에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.

레인 1: *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 용출액의 12번 분액

레인 2: 대조균 대장균 용출액의 12번 분액

레인 3: *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 용출액의 13번 분액

레인 4: 대조균 대장균 용출액의 13번 분액

레인 5: *AtKAPAS* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 용출액의 14번 분액

레인 6: 대조균 대장균 용출액의 14번 분액

도 4는 기질인 피메로일 CoA(pimeloyl CoA)에 대한 정제된 단백질의 기질 특이 효소 활성도를 측정하기 위하여, 기질의 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여 이중역수도표(Lineweaver-Burk plot)로 나타낸 것이다.

도 5는 안티센스 방향으로 *AtKAPAS* 유전자가 도입된 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

도 6a는 안티센스 방향으로 *AtKAPAS* 유전자가 도입된 형질전환 애기장대의 종자에 서 자란 묘목(바이오틴을 첨가한 화분에서 생장, 분화된 묘목)의 사진이다.

도 6b는 안티센스 방향으로 *AtKAPAS* 유전자가 도입된 형질전환 애기장대의 종자에서 자란 묘목(바이오틴을 첨가하지 않은 화분에서 생장, 분화된 묘목)의 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<16> 본 발명은 식물에서 분리된 신규 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 식물의 바이오틴 생합성 과정에 관여하는 신규 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 그리고 상기 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하여 바이오틴 생합성을 저해함으로써 식물의 생장 억제를 유발하는 방법에 관한 것이다.

<17> 바이오틴(biotin)은 가장 최근에 발견된 비타민 B군의 한 종류로서, 동물이나 식물의 생장에 필수적인 비타민이다. 바이오틴은 지방산이나 탄수화물 대사와 관련된 카르복실화(carboxylation), 디카르복실화(decarboxylation), 그리고 트랜스카르복실화(transcarboxylation) 반응 동안 CO_2 를 특이적 기질로 운반하는 효소내 조효소 역할을 담당하고 있다. 박테리아, 식물 및 몇몇 균은 자체내에서 바이오틴을 합성할 수 있는 반면, 대부분의 균류와 동물은 바이오틴 생합성 과정이 결여되어 있기 때문에 외부 환경으로부터 바이오틴을 반드시 섭취하여야 한다.

- <18> 대장균(*Escherichia coli*)과 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)에서 최초로 바이오틴 생합성 경로가 발견된 이래로(Eisenberg MA, *Adv. Enzymol.*, 38:317-372, 1973; Pai CH, *J. Bacteriol.*, 121:1-8, 1975), 생화학 및 유전학 연구를 통한 박테리아의 바이오틴 생합성 경로에 대한 연구가 다양하게 진행되었다(Ploux and Marquet, *Biochem. J.*, 283:327-331, 1992; Alexeev *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 235:774-776, 1994; Huang *et al.*, *Biochemistry*, 34:10985-10995, 1995).
- <19> 이러한 연구를 통하여 대장균과 바실러스 썩틸리스와 같은 미생물의 바이오틴 생합성 경로의 각 단계에서 어떠한 유전자가 그 역할을 담당하는지에 대해서 명확하게 규명되었다. 즉, 대장균의 경우에는 *bioABFCD*의 5개 유전자로 구성된 한 개의 *bio* 클러스터(cluster)가 존재하며, 바실러스 썩틸리스의 경우 *bioWAFDBI* 6개 유전자로 구성된 한 개의 *bio* 클러스터가 존재한다(Bachman BJ, *Microbiol. Rev.*, 54:130-197, 1990; Bower *et al.*, *J. Bacteriol.*, 178:4122-4130, 1996). 반면, 바실러스 스페아리쿠스(*Bacillus sphearicus*)의 경우 7개의 유전자로 구성된 두 개의 분리된 클러스터인 *bioXWF* 및 *bioDAYB*가 존재한다. 한편, 대장균에서는 BirA라는 단백질이 *bioA* 및 *bioB* 유전자 사이의 부위와 결합하는 것에 의하여 바이오틴의 발현을 억제한다고 알려져 있다(Barker and Campbell, *J. Mol. Biol.*, 146:469-492, 1981).
- <20> 대장균의 바이오틴 생합성 과정에서 첫 번째 단계는 KAPA 신타제(7-keto-8-aminopelargonic acid synthase)에 의해 촉매되는 L-알라닌(L-alanine)과 피메로일 CoA(pimeloyl CoA)의 KAPA(7-keto-8-aminopelargonic acid, also known as 8-amino-7-oxononanoate; AON)로의 탈카르복실화 응축(decarboxylative condensation)

반응이다. 대장균의 *bioF* 유전자 산물인 KAPA 신타제는 피리독살 5'-포스페이트-의존 효소(pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme)이며, 약 42 kDa의 분자량을 갖고 있다.

<21> 이와 같이, 미생물의 바이오틴 생합성 경로에 대해서는 잘 알려져 있지만, 식물의 바이오틴 생합성 경로에 대해서는 상대적으로 잘 알려져 있지 않으며, 특히, 바이오틴 생합성 초기 단계에 관여하는 KAPA 신타제에 대해서는 더욱 알려져 있지 않다. 그러나, 식물에서도 대장균에서와 같은 경로를 통하여 바이오틴이 합성된다는 몇몇 흥미로운 증거가 보고된 바 있다(Baldet *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 217:479-485, 1993). 또한, 식물에서의 바이오틴 합성과 이용 과정은 바이오틴닐레이션된 단백질(biotinylated protein)의 분석(Nikolau *et al.*, *Anal. Biochem.*, 149:448-453, 1985; Tissot *et al.*, *Biochem. J.*, 314:391-395, 1996) 및 영양소 요구 돌연변이체(auxotrophic mutants)의 분리 및 특성 연구 등을 통하여 점차로 밝혀지고 있다. 특히, 영양소 요구 돌연변이체의 연구와 같은 정밀한 돌연변이 연구는 바이오틴 생합성과 조절에 대해 보다 많은 정보를 제공하였다.

<22> 즉, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 *bio1* 영양소 요구 돌연변이체는 KAPA에서 7,8-디아미노페랄고닉산(7,8-diaminopelargonic acid; DAPA)으로 전환되는 반응 단계가 결핍되어 있는 돌연변이체이다(Meinke DW, *Theor. Appl. Genet.*, 72:543-552, 1985). 또한, *bio2* 돌연변이체는 디티오바이오틴(dethiobiotin)이 바이오틴으로 전환되는 바이오틴 생합성 경로의 마지막 반응 단계가 결핍된 돌연변이체이다(Patton *et al.*, *Plant Physiol.*, 116:935-946, 1998).

<23> 이러한 연구들은 식물의 바이오틴 생합성 경로에 대한 연구가 환경친화적인 제초제의 개발에 대한 가능성을 제공할 수 있음을 제시하였다. 즉, 바이오틴 생합성 경로는

식물의 성장에는 필수적이며, 동물 및 인간에게는 존재하지 않기 때문에, 바이오틴 생합성을 저해한다면, 동물이나 인간에게는 영향을 미치지 않으면서, 유해한 식물의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 가능성이 크다고 할 수 있다. 렌디나 등(Rendina *et al.*)은 박테리아의 디티오바이오틴 신터테이즈(bacterial dethiobiotin synthetase; DTBS)를 표적으로 하여 새로운 제초제 개발을 시도한 바 있다(Rendina *et al.*, *Pesticide Sci.*, 55:236-247, 1999). 그러나, 아직까지 식물의 바이오틴 생합성 과정에 대해서는 완전하게 알려져 있지 않을 뿐만 아니라, 생합성 과정에 관계된 유전자를 표적으로 하여 환경 친화적이면서도 유해한 식물의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 방법에 대해서는 연구가 미미한 편이다. 또한, 종래 사용되었던 대부분의 제초제의 경우, 식물체내에서의 대사의 기능이 명확하게 파악되지 못하고 있는 실정이다.

<24> 이에 본 연구자들은 애기장대를 대상으로 바이오틴 생합성 경로에 대한 연구를 수행하여 바이오틴 생합성 경로의 첫 번째 단계에 관여하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 분리하고 그 기능을 분석하였다. 또한, 상기 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 기능을 억제하는 것이, 식물의 성장에 치명적인 영향을 미침을 확인하여 상기 폴리뉴클레오티드와 이로부터 발현된 폴리펩티드가 새로운 제초제 개발에 있어 우수한 표적이 될 수 있음을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<25> 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 식물의 바이오틴 생합성을 저해하여 식물의 생장 억제를 유발할 수 있는 환경친화적인 신규 제초제를 개발하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<26> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 제공한다.

<27> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩티드를 암호화하는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<28> 아울러, 본 발명은 상기 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하여 바이오틴 생합성을 저해함으로써 식물의 생장 억제를 유발하는 방법을 제공한다.

<29> 본 발명의 기재에 있어, 애기장대의 KAPA 신타제를 암호화하는 유전자는 이탤릭체를 이용하여 "*AtKAPAS* 폴리뉴클레오티드", "*AtKAPAS* 유전자" 또는 "*AtKAPAS*"로 나타내었으며, 이에 의해 암호화되는 단백질은 "*AtKAPAS* 폴리펩티드", "*AtKAPAS* 단백질" 또는 "*AtKAPAS*"로 나타내었다.

<30> 이하 본 발명을 상세히 설명하다.

<31> 본 발명은 바이오틴 생합성에 관여하는 신규 폴리펩티드를 제공한다. 상기 폴리펩티드는 대장균 바이오틴 생합성 경로의 첫 번째 단계에서 L-알라닌(L-alanine)과 피메로일 CoA(pimeloyl CoA)를 KAPA(7-keto-8-aminopelargonic acid)로 전환시키는 역할을 담

당하고 있는 대장균의 KAPA 신타제(synthase)와 동일한 기능을 갖고 있으며, 애기장대()로부터 분리된 것을 특징으로 한다.

<32> 또한, 본 발명은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드인 *AtKAPAS*(*A rabidopsis thaliana KAPA synthase*)를 제공한다. 상기 *AtKAPAS*는 약 51.3kDa의 분자량을 갖고 469개의 아미노산을 암호화하는 1410bp크기의 전사해독틀(open reading frame)을 포함하고 있다.

<33> 한편, 상기 *AtKAPAS*로부터 추정되는 아미노산 서열은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 스파에리쿠스(*Bacillus sphaericus*)의 바이오틴 생합성에 관여하는 단백질인 KAPA 신타제를 암호화하는 유전자인 *bioF* 유전자(각각 GeneBank accession number NP286539, NP390900, JQ0512)의 서열과 각각 28%, 34%, 38%의 동일성 및 43%, 52%, 54%의 유사성을 갖고 있다. 또한, 상기 아미노산 서열은 C-말단 부위에 아미노트랜스퍼라제 클래스 I(aminotransferase class I) 및 클래스 II 도메인을 포함하고 있어 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 KAPA 신타제 기능 이외에 아미노트랜스퍼라제 기능을 수행할 수 있음을 추정할 수 있다. 또한, 상기 아미노산 서열은 플라즈마 멤브레인 스팬닝 부위(plasma membrane spanning region)로 추정되는 도메인을 포함하고 있다.

<34> 본 발명의 일 실시예에서는 *AtKAPAS* cDNA를 pCAL-n 벡터(Stratagene, USA)에 삽입하여 pCKAPA 재조합 벡터를 제조하였고, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균을 생명공학연구소 유전자 은행(Korean Collection for Type Cultures)에 2002년 3월 26일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 10210BP). 상기 pCAL-n 벡터는 칼모듈린-결합 펩티드 표지(calmodulin-binding peptide tag) 서열을 포함하고 있기 때문에 상기 벡터로부터 발현

되는 단백질은 칼모듈린 레진(calmodulin resin)에 의해 쉽게 분리될 수 있다는 이점이 있다.

- <35> 한편, 본 발명에서는 서열번호 2로 표시되는 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하여 바이오틴 생합성을 저해함으로써 식물의 생장 억제를 유발하는 방법을 제공한다.
- <36> 상기에서 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에 공지된 방법, 즉, 안티센스 폴리뉴클레오티드 도입, 유전자 제거(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 도입, 동종 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포전 태깅(transposon tagging) 등의 방법이 이용될 수 있으며, 구체적으로 본 발명에서는 안티센스 폴리뉴클레오티드를 식물체내에 도입하는 방법을 이용하였다. 이를 위해, 본 발명에서는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드인 *AtKAPAS*에 대한 안티센스 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 구성체(construct)를 제조하였다. 즉, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 안티센스 방향으로 pSEN 벡터에 삽입하여 pSEN-K 재조합 벡터를 제조하였고, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균을 생명공학연구소 유전자 은행(Korean Collection for Type Cultures)에 2002년 3월 26일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 10211BP).
- <37> 일반적으로 안티센스 폴리뉴클레오티드는 핵산(RNA 또는 DNA)내 표적 뉴클레오티드 배열과 결합하여, 상기 핵산의 기능 또는 합성을 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다. 즉, 어떤 특정한 유전자에 상응하는 안티센스 폴리뉴클레오티드는 RNA 및 DNA 양자 모두에 혼성화하는 능력을 지님으로써, 전사(transcription) 또는 번역(translation) 레벨에서의 특정 유전자의 발현을 방해하는 특징을 가지고 있다.

- <38> 한편, 상기에서 폴리펩티드의 기능 억제는 화학물질의 처리에 의해 이루어지는 것이 바람직하다. 상기에서 폴리펩티드의 기능 억제를 위해 사용되는 화학물질은 바이오틴 생합성 경로에서 KAPA 신타제에 대한 기질로 작용하는 피메로일 CoA의 유도체일 수 있다. 즉, 본 발명의 일 실시예에도 기재한 바와 같이, 상기 *AtKAPAS* 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는 폴리펩티드는 피메로일 CoA에 대하여 높은 기질 특이성을 갖고 있다. 따라서, 피메로일 CoA와 경쟁적 억제제로 작용하는 피메로일 CoA 유도체는 식물의 바이오틴 생합성을 효과적으로 저해할 수 있고, 이에 따라 식물의 생장 억제를 유발하는 데 사용될 수 있다.
- <39> 상기와 같이, 폴리펩티드의 발현 억제나 기능 억제를 통하여 바이오틴 생합성이 저해되면 식물의 생장이 억제되고, 결과적으로 식물의 치사가 유발될 수 있다.
- <40> 본 발명의 다른 실시예에서는 제조된 pSEN-K 재조합 벡터를 애기장대에 형질전환시켜 *AtKAPAS*로부터의 단백질 합성을 저해시켰고, 그 결과, *AtKAPAS*에 대한 안티센스 구성체에 의하여 식물 생장의 심각한 지연, 잎의 황화 현상 및 식물체 치사가 유도됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 안티센스 구성체에 의한 식물생장의 효과적인 저해로 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 신규 제초제 개발을 위한 좋은 표적이 될 수 있음을 확인하였다.
- <41> 한편, 본 발명에서는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드를 선별 마커로 사용하는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물의 선별방법을 제공한다.
- <42> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<43> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<44> <실시예 1> 애기장대로부터 대장균 *bioF* 유사 유전자의 분리

<45> 바이오틴 생합성 경로의 KAPA 신타제를 암호화하는 유전자인 대장균 *bioF*에 대응하는 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위한 스크리닝을 수행하였다.

<46> 1-1) 애기장대의 재배 및 배양

<47> 애기장대는 토양이 함유된 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(2% sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(0.8% agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지가 포함된 페트리 디쉬에서 배양하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 성장 챔버(growth chambers)내에서 배양하였다.

<48> 1-2) RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

<49> 애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화단계의 애기장대 잎으로부터 TRI 시약(Sigma, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 mRNA 분리 키트(Pharmacia, USA)의 프로토콜에 따라 poly(A)+ RNA를 분리하였다. 프라이머(primer)로 *NotI*-(dT)₁₈을 이용하여 poly(A)+ RNA와 cDNA 합성 키트(Time Saver cDNA synthesis kit, Pharmacia, USA)로 이중 가닥의 cDNA를 제조하였다.

<50> 1-3) *bioF* 유사 유전자 분리

- <51> 대장균 *bioF* 유전자의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고, 제한효소 *Ban*HI의 서열이 포함된 정방향 프라이머와 서열번호 4로 표시되고, 제한효소 *Hind*III의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 실시에 1-2)에서 제조된 애기장대 cDNA 라이브러리로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.
- <52> 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 51.3kDa의 분자량을 갖는 469개의 아미노산을 암호화하는 1410bp 크기의 전사해독틀(open reading frame)을 포함하고 있음을 확인하였고, 이를 *AtKAPAS*(*Arabidopsis thaliana* KAPA synthase)로 명명하였다.
- <53> 상기 유전자로부터 추정되는 아미노산 서열을 대장균, 바실러스 섭틸리스, 바실러스 스파에리쿠스의 *bioF* 유전자(각각 GeneBank accession number NP286539, NP390900, JQ0512) 서열과 비교하여 본 결과, 각각 28%, 34%, 38%의 동일성 및 43%, 52%, 54%의 유사성을 가짐을 확인할 수 있었다(도 1 참조).
- <54> 또한, 상기 단백질은 C-말단 부위에 아미노트랜스퍼라제 클래스 I(aminotransferase class I) 및 클래스 II 도메인을 포함하고 있으며, 플라스마 멤브레인 스팬닝 부위(plasma membrane spanning region)로 추정되는 도메인을 포함하고 있었다.
- <55> <실시에 2> 대장균에서 *AtKAPAS* 유전자로부터 발현되는 단백질의 정제
- <56> 2-1) 단백질의 발현 유도

<57> 상기 실시예 1-3)에서 분리한 *AtKAPAS* cDNA 전장 부위를 포함한 증폭된 DNA 단편 (fragment)을 *Bam*HI 제한효소와 *Hind*III 제한효소로 절단하였으며, pCAL-n 벡터 (Stratagene, USA)의 *Bam*HI 제한효소와 *Hind*III 제한효소 부위에 클로닝하여 pCKAPA 재조합 벡터를 제작하였다.

<58> 상기 pCKAPA 재조합 벡터를 대장균 BL21-Gold(DE)(Stratagene, USA)에 형질전환시킨 후(기탁번호 : KCTC 10210BP), 암피실린(ampicillin)이 100 μ g/ml로 포함된 LB(Luria-Bertani broth, USB, USA) 배지에서 O.D.600 값이 0.7이 될 때까지 37℃에서 150rpm으로 교반하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가한 후에 2시간 더 배양하였다. 배양된 세포를 50mM MgSO₄와 0.4M NaCl이 포함된 50mM-포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0)로 세척한 후, 다시 4,000 \times 에서 15분 동안 원심분리하였고, 침전물을 모아 -20℃에서 보관하였다.

<59> 2-2) 단백질의 정제

<60> 상기 실시예 2-1)에서 얻은 세포 침전물을 CaCl₂ 결합 버퍼(binding buffer; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol, 1.0mM magnesium acetate, 1.0mM imidazole, 2mM CaCl₂)에 현탁하였다. 상기 세포 현탁액에 라이소자임(lysozyme)을 최종 농도가 200 μ g/ml이 되도록 첨가하고, 15분 동안 회전시킨 후, 30초 동안 초음파 분쇄를 수행하였다. 분쇄된 시료를 5분 동안 얼음에서 냉각시켰고, 이러한 과정(초음파 분쇄 후 냉각)을 3회 반복 실시하였다. 상기 시료를 10,000 \times 에서 5분 동안 원심분리하였고, 상층액을 모아 칼모듈린 어피니티 크로마토그래피(calmodulin affinity

chromotography)를 이용하여 정제하였다. 즉, 평형된 칼모듈린 어피니티 레진 (equilibrated calmodulin affinity chromatography resin)에 상기 상층액(조추출물)을 적용하였고, 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 레진에 붙지 않은 단백질 및 다른 물질들은 제거하기 위하여 CaCl_2 결합 버퍼로 컬럼을 세척하였고, 칼모듈린이 결합된 단백질을 용출버퍼(elution buffer; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM β -mercaptoethanol, 2mM EDTA, 150mM NaCl)를 이용하여 컬럼 매트릭스(column matrix)로부터 분리하였다. 대조군으로는 pCAL-n 벡터로 형질전환된 대장균의 조추출물로부터 분리된 단백질을 사용하였다.

<61> 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, pCKAPA 재조합 벡터로 형질전환된 대장균으로부터 분리된 분액들 중 12번 분액 내지 14번 분액(fraction)에서 단백질의 양이 가장 높게 나타났음을 알 수 있었다. 또한, 상기 단백질의 정제를 확인하기 위하여 pCKAPA 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 및 대조군 대장균으로부터 분리된 용출액 중 12번 분액 내지 14번 분액을 대상으로 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, pCKAPA 재조합 벡터로 형질전환된 대장균에서 분리된 용출액이 55kDa 크기의 융합 단백질(*AtKAPAS* 유전자로부터 발현되는 단백질의 분자량 51.3kDa + 칼모듈린 결합 펩티드의 분자량 4kDa)을 포함하고 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 대조군 대장균의 용출액에서는 상기 크기의 단백질을 포함하고 있지 않음을 확인할 수 있었다.

<62> <실시예 3> 단백질의 효소활성도 분석

- <63> 상기 분리된 단백질이 바이오틴 생합성에 관여하는 KAPA 신타제의 기능을 갖고 있는지 확인하기 위하여 피메로일 CoA(pimeloyl CoA)를 기질로 사용하여 효소 활성도를 측정하였다.
- <64> 상기 단백질의 효소 활성도는 30℃로 조절되는 스펙트로포토미터(Backman DU series 60 spectrophotometer)를 사용하여 340nm에서 알렉시브 등(Alexeev *et al.* *J. Mol. Biol.*, 284:401-419, 1998)의 방법에 의해 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 반응액 1ml에는 20mM 포타슘 포스페이트(potassium phosphate, pH 7.5), 1mM NAD⁺, 3mM MgCl₂, 0.1 유닛 α -케토글루타레이트 디하이드로게나제(α -ketoglutarate dehydrogenase), 실시예 2-2)에서 정제된 단백질 2-10 μ g이 포함되어 있다. 모든 반응액에서 상기 단백질의 농도는 10 μ M이었다. L-알라닌과 피메로일 CoA를 각 반응용액에 농도별(0 내지 30 X 10⁸M⁻¹)로 첨가하여 측정하였다. 결과는 소프트-팩 모듈 키네틱스 소프트웨어(Soft-Pac Module kinetics software)를 이용하여 분석하였다. 분석 전에 효소 샘플을 100 μ M PLP(pyridoxal 5'-phosphate)가 포함된 20mM 포타슘 포스페이트(pH 7.5) 버퍼로 4℃에서 2시간 동안 투석하였다. 효소활성 측정을 위한 대조군으로는 상기 정제된 단백질을 제외한 다른 성분들이 함유된 큐벳을 사용하였다.
- <65> 상기 정제된 단백질의 효소 활성도는 기질인 피메로일 CoA에 대한 미카엘리스-멘텐 키네틱스(Michaelis-Menten kinetics)에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, 이중역수 도표(Lineweaver- Burk's plot)로 나타낸 결과(도 4 참조), K_m 값 및 V_{max} 값이 각각 5.4 $\times 10^{-7}$ M 및 7.93으로 나타났다. 이러한 결과는 *AtKAPAS* 유전자로부터 발현되는 단백질이 피메로일 CoA에 대한 기질 특이성을 갖는 KAPA 신타제임을 나타낸다. 또한, 대장균 및 바실러스 스파에리쿠스의 KAPA 신타제의 피메로일 CoA에 대한

K_m 값이 각각 0.5mM 및 2.5mM인데 반해, 본 발명에서 분리한 단백질의 K_m 값은 $5.4 \times 10^{-7}M$ 로 높은 값을 나타냈다. 즉, 상기 단백질이 대장균이나 바실러스와 비교하여 피메로일 CoA에 대한 높은 기질 특이성을 갖고 있음을 알 수 있다.

<66> <실시예 4> AtKAPAS 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석

- <67> 4-1) *AtKAPAS* 유전자에 대한 안티센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조
- <68> 상기 실시예 2-2)에서 정제한 단백질의 생리학적 특성을 확인하기 위하여 *AtKAPAS* 유전자가 안티센스방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *AtKAPAS* 전사체 발현을 억제하였다.
- <69> 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되고, *Bg*III 부위가 포함된 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *AtKAPAS* DNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bg*III로 절단하고, 발아시기에 식물체의 치사를 피하기 위하여 pCAMBIA-1301 벡터(포항 공대 생명과 실험실로부터 제공받아 사용함)의 CaMV 35S 프로모터 대신에 *sen1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 안티센스 방향으로 클로닝하여 *AtKAPAS* 유전자에 대한 안티센스 구성체인 pSEN-K 재조합 벡터를 제작하였다(도 5 참조). 상기에서 *sen1* 프로모터는 식물의 생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.
- <70> 상기 pSEN-K 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(

Agrobacterium tumefaciens)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀값이 2.0이 될 때까지 IM(Infiltration Medium; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴ Pa의 진공하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 호일(polyethylene foil)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 및 안티센스 *AtKAPAS* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<71> 4-2) T1 형질전환 애기장대의 특성 분석

<72> 상기 실시예 4-1)에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농사, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 형질전환된 애기장대는 대조군(pSEN 벡터로 형질전환된 애기장대)과 비교하여 생장이 지체되거나 치사되는 현상을 보였다.

<73> 한편, *AtKAPAS* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)로 형질전환된 형질전환 식물이 바이오틴 영양소 요구 돌연변이체인지를 확인하기 위하여 바이오틴 첨가에 의해 어떻게 반응하는지 알아보았다. 우선, 바스타 제초제에 30분 동안 침지된 5000개의 형질전환 종자를 5μM의 바이오틴이 첨가되거나 첨가되지 않은 MS 배지를 포함하는 페트리 디

쉬에서 배양하였다. 또한, 상기 형질전환 종자를 1mM 바이오틴이 첨가되거나 첨가되지 않은 모래가 포함된 화분에서 배양하였다. 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서의 애기장대 생장 양상을 조사하였다.

<74> 그 결과, 바이오틴이 첨가된 화분에서는 16개의 개체가 성장하였고, 야생형 애기장대와 비교해 볼 때 큰 표현형의 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 바이오틴이 첨가되지 않은 화분에서는 11개의 개체만이 성장하였고, 이 중 4 개체는 생장 지체 현상, 2 개체는 치사 현상을 보였으며, 잎이 누렇게 되는 현상 또한 발생하였다(도 6a 및 도 5b 참조). 따라서, 상기 *AtKAPAS* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)로 형질전환된 식물체가 바이오틴 영양소 요구 돌연변이체임을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

<75> 본 발명에서는 식물의 바이오틴 생합성 과정에 관여하는 폴리펩티드 및 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 그리고, 상기 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 기능을 억제하여 바이오틴의 생합성을 저해함으로써 결과적으로 식물의 생장 억제를 유발하는 방법을 제공하였다. 바이오틴 생합성 과정은 동물 및 인간에게는 존재하지 않으므로, 상기 바이오틴 생합성 과정에 관여하는 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 기능을 불활성화 시킬 수 있는 제초제는 동물 및 인간에게는 무해하다는 이점이 있다. 따라서, 환경친화적이고 안전한 제초제로 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, C-말단에 아미노트랜스퍼라제 클래스 I 및 II 도메인 (aminotransferase class I and II domain)을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

【청구항 4】

제 1항의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 6】

제 4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, pCKAPA인 재조합 벡터.

【청구항 9】

제 8항의 재조합 벡터로 형질전환된 대장균(기탁번호 : KCTC 10210BP).

【청구항 10】

제 4항의 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 폴리뉴클레오티드.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 폴리뉴클레오티드.

【청구항 12】

제 10항의 안티센스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 13】

제 12항에 있어서, 제 10항의 안티센스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, pSEN-K인 재조합 벡터.

【청구항 15】

제 14항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체(기탁번호: KCTC 10211BP).

【청구항 16】

제 1항의 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하여 바이오틴 생합성을 저해함으로써 식물의 생장 억제를 유발하는 방법.

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 상기 폴리펩티드의 발현 억제는 제 10항의 안티센스 폴리뉴클레오티드 도입, 유전자 제거(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 도입, 동종

재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포전 태깅(transposon tagging)에 의한
것임을 특징으로 하는 식물체의 생장 억제를 유발하는 방법.

【청구항 18】

제 4항 또는 제 10항의 폴리뉴클레오티드를 선별 마커로 사용하는 것을 특징으로 하는
형질전환 식물 선별방법.



20038011



출력 일자: 2003/7/9

【도면】

【도 1】

AtKAPAS **QADHS**QDKTVE**EA**VNVLES**ROILRS**LRPIcmstrqneeeivksr**EN**SDGYE**VFD**glcqw
E. coli BioF **S**QEKIN**A**L DARRAADAL**RRY**EV **Q**SAGR**W**L**A**D
B. subtilis BioF **K**KID**S**Q LNERLDRMKEAGV**R**N**R**SM **D**SAP **T**PE
B. sphaericus BioF **S** NDRFRRELQV**IE**QGLTR**K**RL**F** **S** ST**NE**SEV**Y**MN

AtKAPAS rtsvevsvsiptfgkwlhdepsngEEIfsgdalaecr**K**r**K**K**L**ESS**ND**VLGLSS**H**PT
E. coli BioF **D**ROV**L**ESS**ND**VLGLS**H**PQ
B. subtilis BioF **R**NI **D**S ENQTV**W**SS**Y**N**Y**LG**L**ASDRR
B. sphaericus BioF **S** **K**K**L**ESS**Y**N**Y**LG**L**ATDSR

AtKAPAS **I**SNAA**AN**V**K**D**Y**G**G**P**K**ESA**I**C**S**Y**Y**TY**H**RL**ESS**L**A**Q**L**K**K**EO**CL**V**C**PT**E**FA**AN**naamv
E. coli BioF **I**IR**A**W**Q**Q**G**A**E**D**F****I**L**ES**GS**H**V**S**G**Y**SV**V**H**A**L**E**D**E**L**A**E**W**L**G**Y**S**R**A**L**F**I**S**S**E**FA**AN**
B. subtilis BioF **L**I**D**A**Q**T**O**L**Q**O**F**S**T**SS**S**SR**I**T**S**NS**V**W**E**K**L**E**K**I**A**S**F**R**E**A**A**L**F**SS**Y**L**A**N
B. sphaericus BioF **L**K**K**A**E**GIS**K**I**G**I**S**AG**S**R**I**T**S**N**F**D**I**E**Q**LES**E**L**A**D**F**K**I**N**E**A**I**L**F**SS**Y**L**A**N

AtKAPAS a**I**SVAS**D**Laa**sg**kp**L****R****N**K**V**a**I**FS**D**AL**N**HAS**I**D**G**VR**L**AER**G**gnve**V**F**Y**RR**C**D**I**S**N**C-
E. coli BioF -QAVIAAMM- AK**B**DR- I**A**ADR**S**HAS**L**EAAS**I**SP**S**Q- LRRFA**N**D**V**TH**L**A
B. subtilis BioF -V**S**LS**S**S- EK**D**V- I**S**D**L**UHAS**M**D**G**RLSKAD- TV**Y**RR**I**D**M**D**L**E
B. sphaericus BioF -V**S**ISS**Y**M- I**A**GD**T**- I**S**SD**A**L**N**HAS**I**D**G**RLSKAK- TI**Y**Y**P**I**A**D**M**D**L**E

AtKAPAS -**R**M- K**R**K**V**AV**T**DS**L**ES**M**D**G**D**F**AP**ME**ELS**D****R**K**K**Y**G**FL**V**I**D**AH**S**T**F**C**S**E**N**S**S**
E. coli BioF -RLLASPC**P**C**Q**Q**M**AV**T**EG**V**ES**M**D**G**D**S**AP**L**AE**I**O**Q**V**T**Q**H**NG**W**L**M**VD**A**H**S**T**G**VI**S**E**D**S**S**
B. subtilis BioF **N**S**L**NET**Q**RY**Q**S**R**F**I**AV**T**DS**V**ES**M**D**G**I**E**L**D**Q**I**IS**L**A**R**Y**H**AF**V**VD**A**H**S**T**G**L**S**D**S**S**S**
B. sphaericus BioF **R**K**L**RQ**S**H**G**D**G**L**K**F**I**AV**T**DS**V**ES**M**D**G**I**E**L**P**K**I**VE**L**A**K**Y**K**AY**I**M**D**AH**S**T**G**L**S**D**S**S**S**

AtKAPAS VAB**E**FN**C**EAD**V**L**C**V**G**TLS**K**A**A**S**C**H**G**EP**I**ACS**K**W**K**L**I**Q**S**R**G**RS**F**IE**S**T**A**IE**V**P**M**AAA
E. coli BioF SC**N**LQ**K**V**K**P- E**L**L**V**I**F**CG**R**GF**V**SG**A**AV**L**SS**T**VAD**Y**LL**Q**F**A**RL**I**Y**S**ES**M**D**P**A**Q**A**L**
B. subtilis BioF TS**E**Y**F**GV**C**P- D**I**V**I**TL**S**K**A**V**E**AG**G**H**A**S**S**AV**F**ID**L**LN**H**A**R**TF**I**E**D**FA**I**E**P**AS**C**AAA
B. sphaericus BioF TAD**Y**F**L**G**K**DE**I**D**F**Y**T**LS**K**A**I**SA**E**GG**E**V**S**T**S**IA**K**NY**L**LN**A**RS**F**IE**D**FA**L**SP**S**AI**D**AA

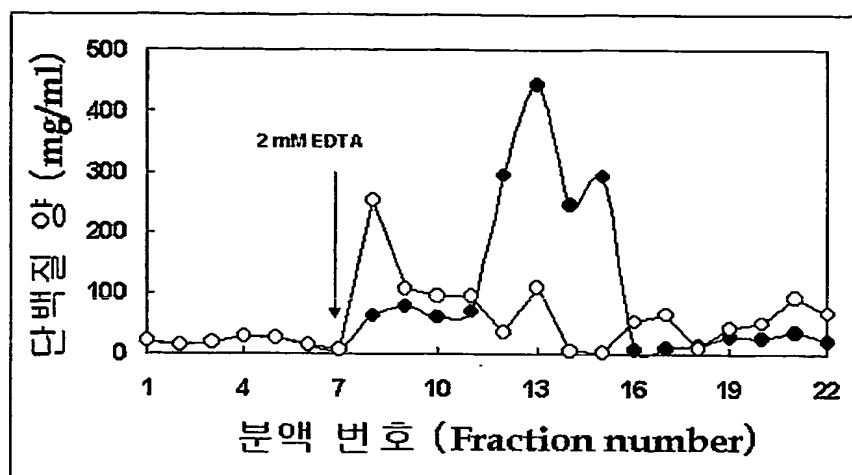
AtKAPAS Y**A**AV**V**W**A**K**E**I**W**- R**R**NA**I**W**E**R**V**K**E**- N**E**LS**G**I- D**I**SS**P**IS**L**W**G**N**O**E**K**AL**K**AS**R**
E. coli BioF R**A**SL**A**IR**S**DE**G**D**A**E**K**L**A**L**I**TR**A**G**V**Q**D**PF**T**L**A**DS**C**SA**I**CP**I**VG**D**NS**R**A**L**OL**A**E
B. subtilis BioF H**E**D**R**NI**E**AS**R**- E- K**R**OLL**F**SV**I**SM**I**RT**S**L**N**MG**V**Y**K**G**D**HT**P**I**P**V**I**L**D**AH**S**T**V**L**F**AE
B. sphaericus BioF REG**I**S**I**IQ**N**D**P**- E- R**R**OLL**K**NA**Q**Y**L**R**L**K**L**E**S**GF**V**KE**G**ET**P**I**S**I**I**ES**S**HE**A**M**Q**F**S**A

AtKAPAS Y**L**L**S**SP**H**A**I**RP**P**TV**P**NS**C**RL**V**TL**S**A**H**IT**E**D**V**K**K**L**I**TA**S**Sc**L**d**F**D**N**T**A**T**I**P**S**f
E. coli BioF K**E**RO**Q**S**C**W**T**A**I**RP**P**TV**P**AG**T**A**R**L**L**TL**A**H**E**MO**I**D**R**L**E**V**I**SG- NG-
B. subtilis BioF K**E**OG**K**Q**I**Y**A**PA**I**RP**P**TV**P**ES**S**R**I**TL**S**D**S**MG**I**D**H**L**O**T**F**HS- I**G**K**E**L**I**I-
B. sphaericus BioF K**I**L**D**ES**V**F**I**PA**I**RP**P**TV**P**SS**S**R**I**TL**S**MG**I**D**H**L**O**T**F**HS- I**G**K**E**M**G**I**V**-

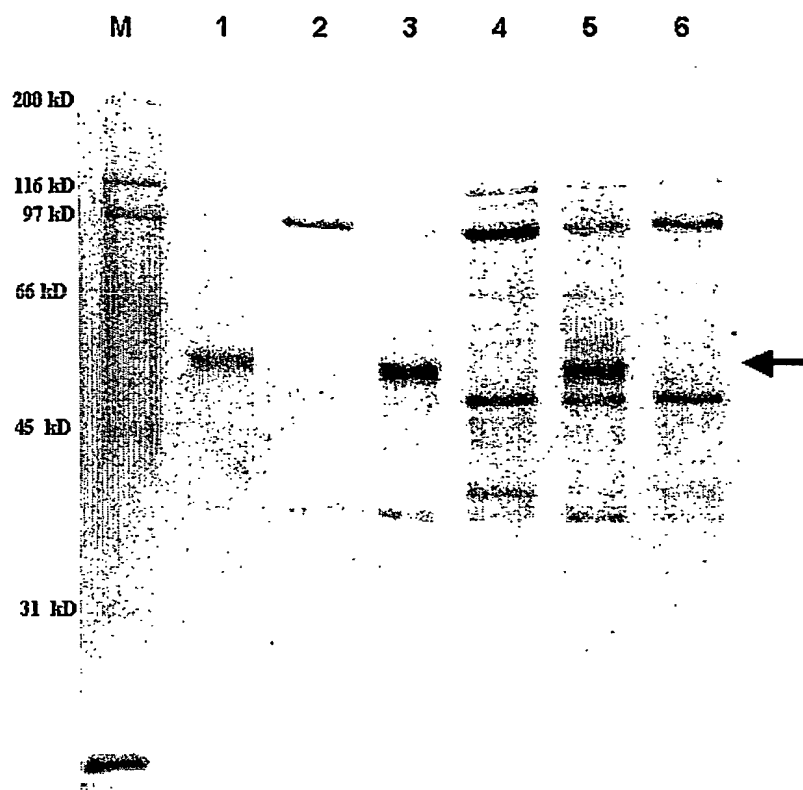
AtKAPAS 1f**p**k1
E. coli BioF -----
B. subtilis BioF -----
B. sphaericus BioF -----

BEST AVAILABLE COPY

【도 2】

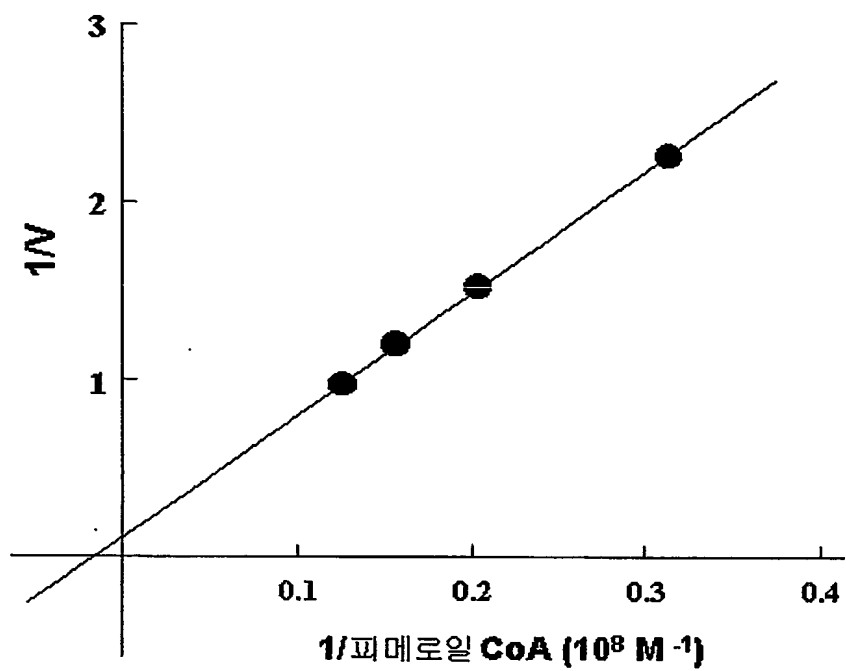


【도 3】

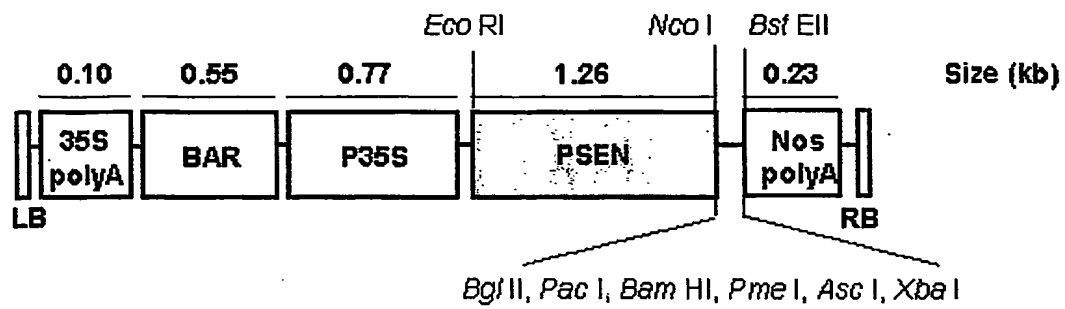


BEST AVAILABLE COPY

【도 4】



【도 5】

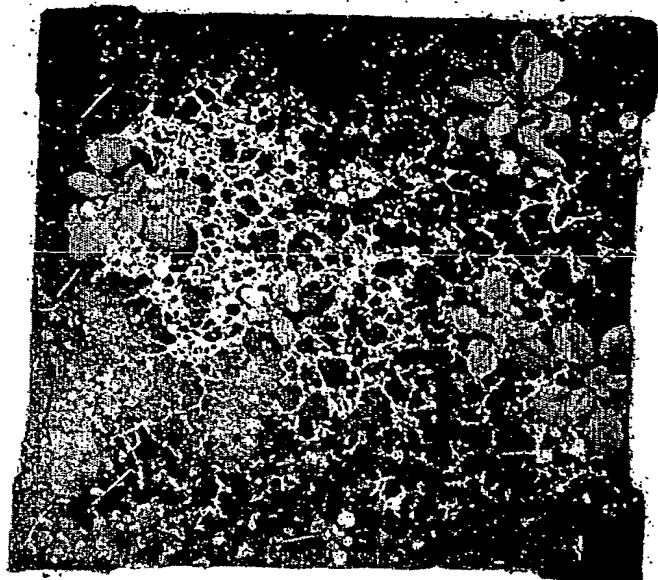


【도 6a】



BEST AVAILABLE COPY

【도 6b】



【서열목록】

<110> GENOMINE INC. <120> Novel polypeptide having function of 7-keto-8-aminop